

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.14.026

原因不明复发性流产患者外周血 NK 细胞亚群及细胞因子水平的研究

陈月婵

河南医学高等专科学校附属医院检验科,河南郑州 451191

摘要:**目的** 分析原因不明复发性流产患者调节性 T(Treg)细胞分泌的细胞因子、外周血自然杀伤(NK)细胞亚群及辅助性 T(Th)相关细胞因子水平。**方法** 选取该院 2018 年 2 月至 2019 年 2 月收治的 41 例原因不明复发性流产患者作为实验组;选取同期于该院进行检查的 41 例健康早孕者作为对照组。检测两组人群 Treg 细胞分泌的细胞因子(TGF- β 、IL-10)、NK 细胞亚群(CD56⁺CD16⁻、CD56⁺CD16⁺、CD56⁻CD16⁺)及 Th1 型细胞因子 IL-2、IFN- γ 、Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 水平。**结果** 实验组 Treg 细胞分泌的 TGF- β 、IL-10 水平显著低于对照组($P<0.05$)。实验组 CD56⁺CD16⁻、CD56⁻CD16⁺ NK 细胞亚群百分比显著低于对照组($P<0.05$)。实验组 CD56⁺CD16⁺ NK 细胞亚群百分比显著高于对照组($P<0.05$)。实验组外周血 IL-2、IFN- γ 细胞因子水平显著高于对照组($P<0.05$);实验组 IL-4、IL-10 等细胞因子水平显著低于对照组($P<0.05$)。**结论** 外周血 Treg 细胞分泌的细胞因子、NK 细胞亚群及 Th 相关细胞因子水平可作为诊断原因不明复发性流产患者的重要参考指标。

关键词:原因不明复发性流产; 调节性 T 细胞; NK 细胞; 辅助性 T 细胞; 细胞因子

中图法分类号:R446.62

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)14-2033-03

NK cell subsets in peripheral blood and cytokine levels in patients with unexplained recurrent abortion

CHEN Yuechan

Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Henan Medical College, Zhengzhou, Henan 451191, China

Abstract: Objective To analyze the levels of cytokines secreted by regulatory T(Treg) cells, NK cell subsets and helper T(Th) cell associated cytokines in patients with unexplained recurrent abortion. **Methods** A total of 41 patients with unexplained recurrent abortion from February 2018 to February 2019 were enrolled in the study as the experimental group, meanwhile 41 healthy early pregnant women who were examined in the same period were enrolled as the control group. The levels of cytokines secreted by Treg cells(TGF- β , IL-10), NK cell subsets (CD56⁺CD16⁻, CD56⁺CD16⁺, CD56⁻CD16⁺) and Th1 type cytokines(IL-2, IFN- γ), Th2 type cytokines(IL-4, IL-10) were measured. **Results** The levels of TGF- β and IL-10 secreted by Treg cells in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The percentages of CD56⁺CD16⁻, CD56⁻CD16⁺ NK cells in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$), and the percentage of CD56⁺CD16⁺ NK cells in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The levels of IL-2 and IFN- γ cytokines in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), the levels of IL-4 and IL-10 in the experimental group were significantly lower than those in the control group($P<0.05$). **Conclusion** The levels of cytokines, NK cell subsets and TH cell related cytokines secreted by Treg cells in peripheral blood can be used as important reference indicators for the diagnosis of unexplained recurrent abortion.

Key words: unexplained recurrent abortion; regulatory cells; NK cell subsets; helper T cell; cytokines

自然流产主要指的是非人为目的造成的妊娠不足 28 周,且胎儿体质量低于 1 kg 的终止妊娠,自然流产者占总妊娠者的 14.2%~19.9%^[1]。复发性流产是自然流产的一种类型,主要指的是持续发生两次或两次以上的自然流产,发生率占 1.5%~4.7%^[2]。复发性流产的病因较为复杂;早期流产可能与以下因素

相关:内分泌系统疾病、胚胎染色体异常、免疫系统疾病;晚期流产可能与以下因素相关:子宫畸形、子宫发育不良。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 2 月至 2019 年 2 月本院收治的 41 例原因不明复发性流产患者作为实验

组;另外,选取同期于本院进行检查的 41 例健康早孕者作为对照组。实验组纳入标准:(1)夫妻双方染色体均正常,(2)既往有自然流产史者,(3)对本研究知情同意;排除标准:(1)遗传性疾病患者,(2)合并严重自身免疫性疾病者。对照组纳入标准:(1)早孕反应正常者,(2)既往生育过足月健康胎儿者,(3)对本研究知情同意;排除标准:(1)有家族遗传病史者,(2)合并严重心、肝、肾功能障碍疾病者。实验组年龄为(33.8±1.9)岁,孕周为(10.8±2.2)周;对照组年龄为(32.3±2.1)岁,孕周为(11.2±2.3)周。

1.2 方法 两组人群在检查前 1 天禁烟酒,保持充足的睡眠,低盐、低脂肪饮食;次日空腹抽取静脉血标本(8~10 mL),离心处理,分离血清,置-80℃保存备用。采用流式细胞仪检测调节性 T(Treg)细胞分泌的细胞因子[转化生长因子-β(TGF-β)、白细胞介素(IL)-10]和外周血 NK 细胞亚群(CD56⁺CD16⁻、CD56⁺CD16⁺、CD56⁻CD16⁺)水平;采用酶联免疫吸附法检测外周血辅助性 T 细胞(Th)相关的 Th1 型细胞因子 IL-2、IFN-γ 和 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 水平)。将室温控制在 24℃ 以下,标本检测在 3 d 内完成。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Student's *t* 检验;所有统计检验均为双侧概率检验,检验水准为 0.05。

2 结 果

2.1 两组间 Treg 分泌的 TGF-β、IL-10 水平比较 实验组 Treg 分泌的 TGF-β、IL-10 水平显著低于对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组外周血 TGF-β、IL-10 水平的比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	TGF-β	IL-10
实验组	41	288.8±40.1	54.0±11.5
对照组	41	566.9±75.4	178.6±35.2
χ^2		1.456 51	5.265 87
<i>P</i>		0.000	0.013

2.2 两组间 NK 细胞亚群百分比的比较 实验组 CD56⁺CD16⁻、CD56⁻CD16⁺亚群百分比显著低于对照组($P<0.05$);实验组 CD56⁺CD16⁺亚群百分比显著高于对照组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组研究对象的 NK 细胞亚群百分比比较($\bar{x} \pm s$, %)

组别	<i>n</i>	CD56 ⁺ CD16 ⁻	CD56 ⁻ CD16 ⁺	CD56 ⁺ CD16 ⁺
实验组	41	56.7±4.1	14.2±2.2	11.3±2.4
对照组	41	70.6±3.3	22.9±3.1	6.6±2.0
<i>t</i>		12.542	18.455	26.986
<i>P</i>		0.002	0.007	0.001

2.3 两组间 Th1 和 Th2 型细胞因子水平的比

较 实验组 IL-2、IFN-γ 水平显著高于对照组($P<0.05$);实验组 IL-4、IL-10 水平显著低于对照组($P<0.05$)。见表 3。

表 3 两组研究对象的 Th1 型和 Th2 型细胞因子表达水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-10
实验组	41	6.2±0.7	612.8±37.4	12.1±1.7	14.0±1.1
对照组	41	3.3±0.6	485.9±55.1	22.5±3.3	23.8±3.9
<i>t</i>		6.455	1.145	12.365	16.011
<i>P</i>		0.002	0.000	0.001	0.004

3 讨 论

有学者认为,复发性流产的发生可能与以下因素密切相关:环境因素、心理因素、生活习惯不良、子宫营养不足等^[3]。部分复发性流产患者的病因较为明确,但是仍然有 50%左右的复发性流产患者病因尚不明确,因此,将其称为原因不明复发性流产^[4]。国外的流行病学研究显示,随着自然流产发生次数的增加,孕妇再次发生胚胎丢失的概率也将增加^[5-6]。原因不明复发性流产的发生将增加孕妇的心理压力,所导致的不良心理情绪作用于孕妇神经系统会影响内分泌系统的调节作用,导致神经递质释放过量反作用于机体系统,造成恶性循环,使得再次妊娠发生流产的概率提高 20%左右^[7]。

随着生殖免疫学的发展与进步,有学者研究认为原因不明复发性流产的发生与免疫因素密切相关^[8]。母体在妊娠过程中,免疫调节机制发生巨大变化,免疫抑制作用也显著加强,但是免疫排斥反应却相应减弱;正常情况下,免疫抑制与免疫排斥反应保持平衡,如果平衡状态被打破,将导致母体的细胞免疫功能发生变化,母胎免疫失衡,出现自然流产情况。

有研究认为,原因不明复发性流产的免疫机制主要涉及以下几个方面,自身免疫,(2)外周血 Treg 细胞,(3)NK 细胞亚群,(4)细胞因子等^[9]。本研究显示,实验组 CD56⁺CD16⁻百分比、CD56⁻CD16⁺百分比显著低于对照组,实验组 CD56⁺CD16⁺百分比显著高于对照组。NK 细胞亚群具有非特异性细胞毒性杀伤效应,NK 细胞通过细胞介导的毒性反应以及激活杀伤细胞反应在机体内发挥细胞毒性作用,从而危害正常的妊娠过程。子宫 NK 细胞在妊娠早期通过分泌多种细胞因子参与到胎盘小血管的重塑中,从而保护正常妊娠。适当数量的 CD56⁻CD16⁺细胞亚群能够有效抵御妊娠过程中的微生物感染作用;过多数量的 CD56⁻CD16⁺将会对胎儿产生排斥反应,导致自然流产^[10]。

Treg 细胞是一种具有免疫调节功能的细胞群,可分泌 TGF-β、IL-10,通过细胞间直接接触抑制自身 T 细胞的免疫性反应,促进抑制性细胞因子的分泌,有

效维持机体内环境的稳定。近年来有关研究资料表明,Treg 细胞在母胎免疫中起着关键作用。TGF-β、IL-10 是参与免疫调节的细胞因子,Treg 细胞通过释放上述两种细胞因子来起到维持机体免疫平衡作用^[11]。IL-10 可诱导滋养细胞,抑制 Th1 细胞,IL-10 水平降低可能会诱发复发性流产。TGF-β 有比较强的免疫抑制作用,通过抑制 T 细胞增殖,从而保护胚胎正常发育;TGF-β 上调能够维持正常妊娠,而 TGF-β 下降则可能会诱发复发性流产^[12]。本研究显示,实验组 Treg 分泌的 TGF-β、IL-10 水平显著低于对照组。

如果子宫 NK 细胞功能亢进,分泌过多 IL-2、IFN-γ 细胞因子,将导致母胎免疫失去平衡,继而发生自然流产事件^[13]。IFN-γ 通过损害滋养细胞发挥细胞毒性作用,IFN-γ 与 IL-2 协同刺激细胞毒性 T 细胞的增殖,从而增强其抗病毒感染能力,导致胚胎发生排斥反应,最终发生自然流产事件^[14-15]。IL-4 可抑制淋巴因子激活杀伤细胞,降低 IL-2 受体表达,除此之外,能够促进人绒毛膜促性腺激素的合成,继而保护正常妊娠^[16-17]。本研究显示,实验组 IL-2、IFN-γ 细胞因子水平显著高于对照组,实验组 IL-4、IL-10 等细胞因子水平显著低于对照组,表明 Th1 型细胞因子表达水平过高不利于正常妊娠,Th2 型细胞因子水平过低不利于正常妊娠。

综上所述,外周血 Treg 细胞、NK 细胞亚群及细胞因子水平可作为诊断原因不明复发性流产患者的重要参考指标。

参考文献

[1] 费倩倩,丁家怡,施蔚红,等.原因不明复发性流产患者血清 IL-33 水平与 TH1、TH2、TH17 及 Treg 细胞间的关系[J].临床检验杂志,2017,35(4):281-284.

[2] 王德胜,王曙光,冯丽燕,等.原因不明性复发性流产患者月经周期外周血调节性 T 细胞水平变化[J].山东医药,2018,58(22):79-81.

[2] 王德胜,王曙光,冯丽燕,等.原因不明性复发性流产患者月经周期外周血调节性 T 细胞水平变化[J].山东医药,2018,58(22):79-81.

[3] 楼向明,刘文华,费小阳.外周血及蜕膜组织中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞比例和炎症因子原因不明复发性流产的关系研究[J].中国性科学,2016,25(6):118-120.

[4] 张玉萍,燕美琴,王丽萍,等.不明原因复发性流产患者外周血调节性 T 细胞和白细胞介素-17 检测及意义[J].中国药物与临床,2017,17(11):1604-1605.

[5] NONAKA T,TOMINAGA M,TAKAHASHI M,et al.

Immunotherapy with paternal lymphocytes for patients with unexplained recurrent abortion and association with blocking antibodies comparison between patient groups with primary and secondary unexplained recurrent abortion[J].J Reprod Med,2018,63(5/6):285-291.

[6] HOSSEINI S,SHOKRI F,POUR S A,et al. Diminished frequency of menstrual and peripheral blood NKT-Like cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion and infertile women [J]. Reprod Sci, 2019, 26 (1):97-108.

[7] 邱佩佩,李小英.原因不明复发性流产患者 Th1/Th2 型细胞因子的表达分析[J].中国妇幼保健,2015,30(9):1414-1416.

[8] 沙静,刘福民,王文,等.免疫球蛋白联合绒毛膜促性腺激素对原因不明复发性流产患者外周血 Th17/Treg 平衡的影响[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2014,12(1):75-79.

[9] 路祥会,王绍娟. URSA 患者外周血细胞因子 IL-10、RANTES 的研究 [J]. 齐齐哈尔医学院学报,2015,17 (28):4223-4225.

[10] 焦永慧,邱佩佩,李小英. Th1/Th2 型细胞因子在复发性流产患者中的表达及意义 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2015,29(11):1118-1120.

[11] 侯俐,宋晓婕,印贤琴,等. URSA 患者血清 IL-2、IL-10 及 MCP-1 与细胞免疫功能相关性研究 [J]. 湖南师范大学学报(医学版),2017,14(2):122-124.

[12] 魏凤香,路祥会,李敏,等. URSA 患者外周血 HOZOT 细胞及细胞因子的研究 [J]. 热带医学杂志,2015,15(7):883-885.

[13] 袁静,李坚. NKT 样细胞及 Th1 型,Th2 型细胞因子表达变化与 URSA 的相关性 [J]. 中华妇产科杂志,2017,52 (2):120-123.

[14] 赵婷,姚吉龙,张华坤,等. HCG 培养自体淋巴细胞宫腔灌注治疗原因不明复发性流产效果观察及作用机制 [J]. 山东医药,2019,59(13):55-57.

[15] 曹井贺,杨爱军,位玲霞,等. 黄体酮联合主动免疫治疗对复发流产相关因子的研究 [J]. 中国妇幼健康研究,2018, 29(4):491-494.

[16] 伍金华,谢志威,车小群,等. 原因不明复发性流产患者外周血 PD-1、Th1/Th2 型细胞因子水平测定及其相关性研究 [J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2014,14(9):1592-1596.

[17] 姜朵生,张迎春,李芳园,等. 中西医结合治疗对原因不明复发性流产患者性激素及外周血免疫细胞的影响 [J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(5):461-463.